616.155.156

網赤血球成熟物質に関する研究

第三編

網赤血球成熟物質の起原とその性格

岡山大学医学部病理学教室（主任：妹尾左知丸教授）
真　田　博　史

〔昭和33年11月24日受稿〕

I 緒　言

第1編に於て著者[1]は，牛肝内にも海猽肝（妹尾，河合)[2)3)]家兎肝(Plum)[4)5)6)]に於けると同様に網赤血球成熟に関与する物質の存在する事を明かにし，第2編に於いては此を抽出する事を企図し，3種類の溶媒即ち水・アルコール及びエーテルを使用し，成熟物質が此等のどの溶媒によつて最もよく抽出されるかを観察し，併せてその化学的性質の大略を明かにしようと考えた．而し有効物質は此等三種類の何れによつても抽出不可能であることが明かにされた．然し此が食塩水によつて抽出可能であることを見出し，此の結果から成熟物質がグロブリン的な蛋白質としての性状を有する事を想定し，食塩水抽出液を pH 5.4 に於て硫安半飽和液で沈澱する部分を集めて検した所，此の蛋白分画に著明な網赤血球成熟促進作用の存在を証明し得た．又此が蛋白変性を起す程度の温度の上昇によつてその作用を失うことから，グロンブリン蛋白そのものではないかと考えるに至つた[7)]．本論では此の物質が細胞の有形成分即ちミトコンドリア或はミクロゾーム等に含まれるものか又は細胞質のヒアロプラスマ中に存在するかを明かにするため，0.25Mの庶糖液を用いて牛肝のホモヂネートを作り，核及び未破壊分画を遠沈して除き，その上清を 18000 g 60分間冷凍超遠心により得た上清と，ミトコンドリア及びミリロゾーム分画の夫々に就て網赤血球成熟の有無を観察した．一方之とは別に肝の生理的食塩水抽出液に就て，蒸溜水抽出液を対照として濾紙電気泳動を行い，成熟物質がγグロブリンの分画に属する分子の可成り大きい蛋白に属し，而も細胞質のヒアロプラスマ中に含まれるものである事を明らかにし得たので茲に報告する．

II 実験材料及び方法

材料として健康な海猽の肝及び新鮮な牛肝を用いた．肝の細胞成分の分離には W.C. Schneider[10)11)12)13)]の方法を用いた．即ち海猽肝に於ては一晩中グリコーゲンを除くため断食さし，牛肝の場合には冷室に於て肝を処理し結締織を除去した．共に重量を計り0.25Mの庶糖液を9倍容でホモゲネートし，その10ccを日立冷凍超遠心器（type 40P）を用いて 600 g 10分間冷凍遠心し沈渣を除去した．即ち核，赤血球，破壊されない肝細胞を除去した．その上清を採り8500 g 10分間でミトコンドリアの層を遠心沈澱した．そしてその沈渣を再び0.25M庶糖液の 25cc の懸濁により洗い，8500 g 10分間で再び遠沈し洗われたミトコンドリアに 2.5cc の生理的食塩水を加えてミトコンドリアの分劃として実験に用いた．上清及びミトコンドリアを洗つた庶糖液を一緒にし，18000 g 60分間でミクロゾームの層を冷凍遠心した．再び前と同様にしてミクロゾームの層を0.25M庶糖液 2.5ccに懸濁して洗い，18000g 60分間で再遠心した．その沈渣に 2.5cc の生理的食塩水を加えミクロゾーム分劃とした．その上清及びミクロゾームを洗つたものは一緒にして生理的食塩水を加えて 20cc とし Supernatant として用いた．之等3者に就いて各々前編でのべた方法に従い試験管内網赤血球成熟を観察した．残りの上清は之を硫酸アンモンで半飽和し[14)]，pH5.4で静置し第二編の方法に従いグロブリン分画を得て此に就いて網赤血球の成熟作用を検した．網赤血球成熟作用の観察はクエン酸ソーダを加えた貧血家兎血液そのものに就いて，又その赤血球を生理的食塩水に浮游させたものについて行つた．一方別に第2編の方法に従つて牛肝の2%食塩水抽出液を作り，之を第1編でのべた方法によつて得られた蒸溜水抽出液を比較しつつ Grassman の装置を用いて濾紙電気泳動を行い（110V．8時間 5～0°C），デンシトメーターにかけて両者の吸光度の曲線を比較した．緩衝液としては Veronal-Veronal Soda, pH 8.6,

μ0.1を用い，濾紙はCarl-Schleicher's 200-Streifen filtrier Papier Nr 2043を使用した．即ち上記濾液をあらかじめ，Veronal bufferに湿し，Grassmanの装置に水平に貼りつけ電解液槽の上に置く．この濾紙の液に浸らない部を水平部として25糎，垂直部として1.5糎，計28糎とした．資料をつける前に此の儘30分位放置して緩衝液の分布が平衡状態になるのをまち，更に使用する電流を10分間位通じ泳動初期にみる抵抗を除いた上一回電流を絶ち，Bufferに湿した基線上の濾紙の部の液を吸取紙にて除去し，資料をクロマト用マイクロパイペツトに0.04ccを採り，基線上に出来るだけ均一に資料をつけ泳動を開始し，8時間泳動後通電を絶ち濾紙をとりはずして乾燥器中で100°C 10分間加熱乾燥して蛋白を熱固定した．その後B.P.B.液（Brom Phenol Blue 0.05瓦 昇汞1.0瓦 醋酸2，qdestにて100とす）にて5～20分間染色し，更に0.5～2.0%の醋酸溶液中に移して濾紙を2回とりかえ，10～20分間洗つた後乾燥しアンモニアガスに曝して発色さした．それを流動パラフィンに浸したものについて小林式デンシトメーター（夏目制作所）によつて吸光度曲線を求めた．

Ⅱ 実験成績

0.25Mの蔗糖液によつて分類した各成分についてその網赤血球成熟能を検した結果では，顕微鏡的に全く有形成分を含まないヒアロプラスマの分画のものは，食塩水抽出液の場合と殆んど同様に家兎網赤血球成熟促進作用がある事を示した．その効果は血液そのままに添加する場合にも，又生理的食塩水浮游網赤血球を使用する場合にも全く同様な結果を示した．次にミトコンドリアの分画をとつて此を一度低張とし有形成分を破壊し，食塩を加えて等張としたものについて行つた実験は，Fig 1～2に示す如く全く網赤血球の成熟能力がない事が明かにされた．ミクロゾーム分画につ

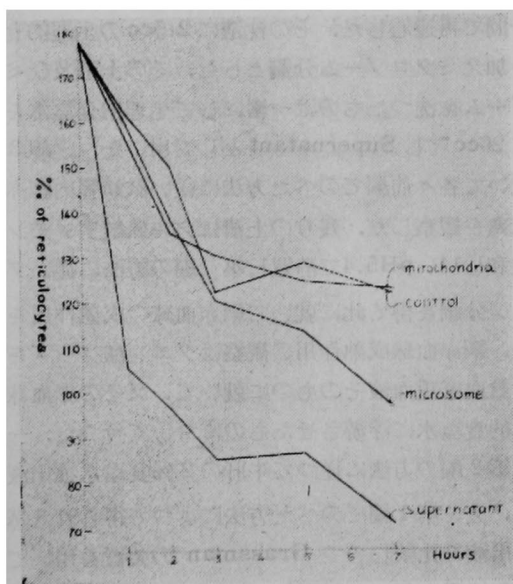
Fig. 1

Effects of the fractions of mitochondria. microsom supernatant of G.P. liver on the maturation of reticulocyt.

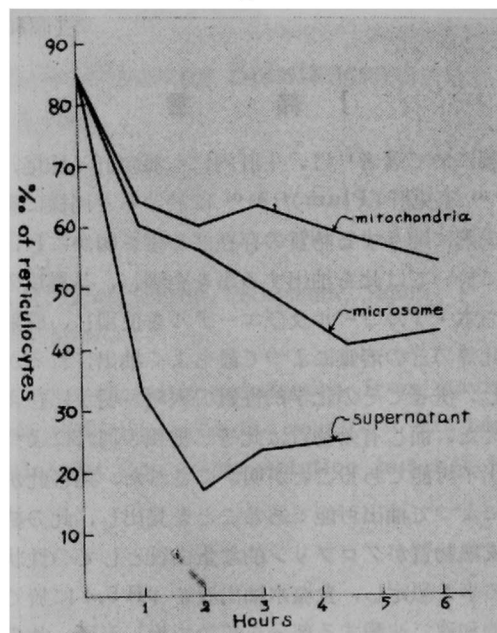
Fig. 2

Effect of fractions of mitochondria, microsome and supernatant of ox liver on the mturation of reticulocytes.

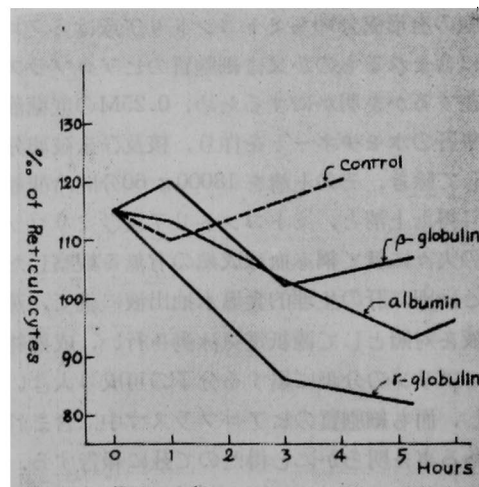
Fig. 3

Effect of protein fractions of the supernant from sucrose extract of ox liver on the maturaton of reticulocytes.

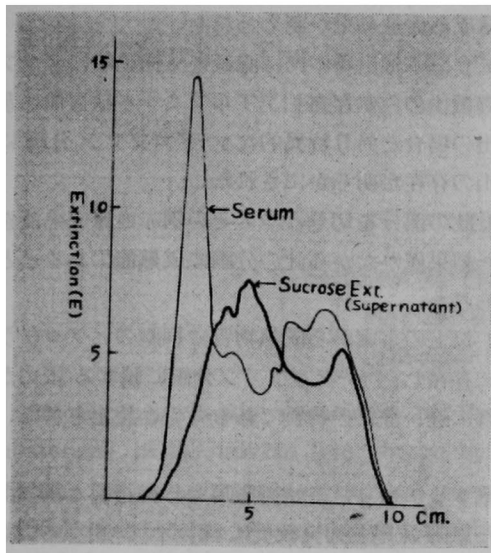
Fig. 4

Protein contents of the supernatant of sucrose extract of ox liver.

Fig. 5

Comparison of protein contts of saline- and water-extractsof ox liver.

いて行つた同様な実験もやはり此の分画には網赤血球の成熟能が殆んどないことが明かにされた．次にヒアロプラスマ分画を硫安の半飽和によつて第二編に於けると同様な操作でグロブリン分画をとつて之に就て網赤血球成熟試験を行つた結果は，Fig.3に示す如く此の部分のグロブリン分画に有効成分が存在する事が明かにされた．以上の事実は網赤血球成熟物質が細胞のヒアロプラスマ中に溶存し，それがヒアロプラスマのグロブリン分画内に存在することを示すものである．

濾紙電気泳動法による観察：

牛肝の蒸溜水抽水物及び2％食塩水抽出物の凍結乾燥物に於て，前者には0.85％生理的食塩水を，後者には乾燥前の液の2倍量の蒸溜水を加えたものに就いて，全く同一の条件で上記の如き方法を用いて濾紙電気泳動を行つた．別に正常家兎血清に就ても同一の条件下に電気泳動させ之を対照とした．結果はFig.5に示す如くである．即ち肝食塩水抽出物には殆んどアルブミン分屑を缺ぎ，その主体はグロブリンであることが示された．之等の中蒸溜水抽出液には β グロブリンの分屑が多く，γ グロブリンの分屑が非常に少い事が示されている．然るに食塩水で抽出したものに於ては γ グロブリンの分屑が可成り多く存在し特に顕著な事は，血清蛋白の γ グロブリン分画の非常に分子の大きい部分に一致して特異的な蛋白の出現を認めた．両者の著しい差は此の蛋白分屑にあると云える．

牛肝の0.25M蔗糖液抽出物による Supernatant の濾紙電気泳動的所見は，前述した食塩水抽出物による泳動像と比較して，共にアルブミンの層は全く缺如しその主体はグロブリンであることは前者と同じであるが，蒸溜水抽出物は網赤血球成熟作用が認められない点より両者の間の著しい差は比較的分子の大なる γ グロブリンの屑にある(Fig.4)．此の点より蔗糖液抽出による Supernatant (hyaloplasma) と食塩水抽出物との電気泳動像は類似しており，血清の泳動像と比較して γ グロブリン屑に一致して特異な山を示している．一方此の屑は蒸溜水抽出物の泳動像には見られない．此の著しい泳動像の差と網赤血球成熟作用の差が一致しているので，これらの事実より有効物質は電気泳動的に γ グロブリン屑に一致した蛋白であるものと結論される．

Ⅳ 考　　按

以上の実験に於て明かな如く，網赤血球の成熟物質は細胞の有形成分にはなく，ヒアロプラスマ中にグロブリンの性格を示す蛋白として或は之と結合して存在することが明かにされた．妹尾，河合等の実験によれば肝脾等の網内系細胞中に本物質が存在する事が明らかにされているので，恐らく此の物質は肝網内系細胞のヒアロプラスマ中に溶存するものと考えられる．Plum によれば胃で作られたものが肝の網内系に於て activate されると云うから，此の事もやはり網内系が本物質の形成上に関与していることを示している．肝の食塩水抽出物の電気泳動像から考えて之が蒸溜水抽出物と異り，γ グロブリン分画の比較的分子の大き

いと思われる分屑に特異的な吸収の山を示している．此の点から本物質が此の分屑にある可能性は極めて大きく此の部分を切り取つて行つた網赤血球成熟作用について見た所見では，硫安半飽和による抽出物或は生理的食塩水抽出物の著明な作用は認められなかつた．然し此の場合は各々が非常に少いのでその作用が充分発揮されなかつた事が考えられる．妹尾，河合等の稀釈実験では2^6～2^8倍に稀釈すると既にその効果は半減すると云うから之は恐らく量の問題によるものであろうと思われる．兎に角此の分屑に僅かでも網赤血球成熟促進効果が認められたことは成熟物質が此の分屑に存在するものと考えられる．

V 結 論

1）牛肝の0.25M蔗糖ホモゲネートから得られたミトコンドリア・ミクロゾーム・ヒアロプラスマの3分画に就いて，それ等の網赤血球成熟促進効果をしらべた結果，有効成分はヒアロプラスマに溶存してをり有形成分とは関係のないことが明らかにされた．

2）ヒアロプラスマの成分から硫安半飽和により得られたグロブリン分画にも，食塩水抽出物と同様な網赤血球成熟促進効果が認められた．

3）食塩水抽出物中には濾紙電気泳動的にグロブリン性の蛋白のみが存在し，アルブミンを缺ぎ而も蒸溜水抽出の場合と異り特異的なγ-グロブリン分画に属する山の存在が明らかにされた．

4）此の部分を切りとつてその網赤血球成熟能をしらべた結果僅かながら此の分画に成熟能のあることが認められた．

5）以上の事実から成熟物質は細胞のヒアロプラスマ中に存在し，γ-グロブリン分画に属する蛋白か或はそれに近い性質の物質であるものと想定された．

擱筆するに当り，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾左知丸教授に深甚なる謝意を表します．又種々御教示を戴いた小田助教授，御協力下さつた栗井，内海両先生に心から感謝する．

猶本論文の要旨は第480回岡山医学会に於て発表した．

文 献

1）真田：本誌第1編．
2）Seno, S., Kawai, K., Kanda, S., et al., Mie. Medi J Vol IV Suppl 35～43, 1953.
3）妹尾：生体の科学，2巻，25，72，昭25.
4）Seno, S., Kawai, K. and Nishikawa, K., Ibid. Report III.
5）Plum C. M. Acta physiol Scand,4, 259, 1942.
6）Jacobsen E. Plum. C. M. Acta Physiol Scand, 4, 278, 1942.
7）真田：本誌第2編．
8） 40P型日立分離用超遠心器取扱説明書．
9）小林：森，濾紙電気泳動法の実際．
10）W. C. Schneider, J. B. C. 259, 176, 176.
11）W. C. Schneider. G. H. Hogeboom. J. B. C. 123. 183, 1950.
12）G. H. Hogeboom. W. C. Schneider. G. E. Pallade., J. B. C. 172, 619, 1948.
13）G. H. Hogeboom. W. C. Schneider. G. E. Pallade Proc. Society exptel. Biol. Medi., 65, (2) 320～321, 1947.
14）赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質，共立社，東京．

Studies on Reticulocyte Ripening Subsuances

Part 3. The cellulor Origin and the characterisbics of the Ripening Substance

By

Hiroshi SANADA

Department of Pathology, Okayama University
Medical School, Okayama, Japan
(Director : Prof. Satimaru SENO)

From the results presented in Part 2 it is supposed that the reticulocyte ripening substances in the bovine liver found by the author may be protein belonging to a globulin fraction or a substance attached to some particles of the cytoplasm, which can not be precipitated by the general centrifugation.

The supernatant obtained from the saline extract by centrifuging at a low speed was again put to ultra-centrigu-gation at 40,000 r.p.m., thus splitting fraction into two, soluble fractions and microsome or mitochondrial fractions. Ripening test on reticulocytes proved that the effective substance had been transfered to the soluble fraction. The globulin fraction obtained from the saline exfract by the half saturation with ammonium sulfate also proved to be effective. Electro-paper chromatography of the protein obtained from the saline extract revealed that it contained a fraction of γ-globulın which was found to be lacking in the water extract. Thus the ripening substance of reticulocyte has been prove to be a protein belonging to the γ-globulın fraction originated from the hyaloplasm.